

Title	Gab 1 Acts as an Adapter Molecule Linking the Cytokine Receptor gp130 to ERK Mitogen-Activated Protein Kinase
Author(s)	吉田, 雄一
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41827
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について ご参照 ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名	よし だ ゆう いち 吉 田 雄 一
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 5 2 5 3 号
学 位 授 与 年 月 日	平成12年 3 月 24 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科病理系専攻
学 位 論 文 名	Gab 1 Acts as an Adapter Molecule Linking the Cytokine Receptor gp130 to ERK Mitogen-Activated Protein Kinase (サイトカイン受容体 gp130を介するシグナル伝達におけるアダプター分子 Gab 1 の機能解析)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 平野 俊夫 (副査) 教 授 長田 重一 教 授 米田 悦啓

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

gp130はIL-6ファミリーサイトカイン受容体の共通コンポーネントである。刺激により gp130は2量体化を起こすと共に、細胞膜近傍に会合しているチロシンキナーゼ JAK (Janus kinase) により gp130内のチロシン残基がリン酸化される。さらに、gp130のチロシンリン酸化に伴い、転写因子 STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) やリン酸化チロシン脱リン酸化酵素 SHP-2 (SH2 containing tyrosine phosphatase-2) といった様々な SH2 ドメインを有するアダプター分子が会合し、チロシンリン酸化される。これまで、gp130内の細胞膜寄りのチロシン759に、SHP-2 が会合し、このチロシン759をフェニルアラニンに置換した場合に SHP-2 のチロシンリン酸化と gp130刺激依存性の MAP kinase ERK の活性化が抑制されることが明らかになっている。しかしながら、SHP-2 の脱リン酸化酵素としての基質は不明であった。そこで、gp130刺激依存性に SHP-2 と会合してくる、分子量110kDaのチロシンリン酸化蛋白 (pp110) に注目し、その解析を行った。

【方法ならびに成績】

1. pp110の同定

HepG 2細胞をIL-6で刺激し、抗 SHP-2抗体で免疫沈降した場合に、分子量110kDaのリン酸化蛋白 pp110が免疫沈降された。また、同様に、抗 PI3-Kinase p85抗体で免疫沈降した場合においても、110kDaのリン酸化蛋白を認めた。pp110は刺激依存性に SHP-2 と会合してくることより SHP-2 の脱リン酸化の基質である可能性が予想された。一方、SHP-2 のショウジョウバエホモログ CSW (Corkscrew) の脱リン酸化の基質 DOS (Daughter of Sevenless) がクローニングされ、DOS の哺乳類ホモログとしては、アダプター分子 Gab 1 (Grb 2-associated binder-1) が存在していることがわかった。Gab 1 は Grb 2 と会合してくる分子としてクローニングされた分子で、N末に PH ドメイン、C末に SHP-2 や PI3-kinase との結合モチーフ及びリン酸化チロシン結合ドメインである MBD を有した蛋白であり、その分子量は、pp110とはほぼ同じ115KDであった。そこで human Gab 1 のC末に対するポリクローナル抗体を作製し、pp110が抗 Gab 1抗体にて免疫沈降されるか検討した。この結果、pp110は抗 Gab 1抗体にて免疫沈降され、Gab 1 のリン酸化と並行して SHP-2 と p85がそれぞれ免疫沈降された。以上よりリン酸化された Gab 1 に SHP-2、p85が会合し複合体を形成していることが明らかになった。また、Gab 1 は IL-6 以外の IL-3、IFN α 、 γ といった様々なサイトカイン刺激によっても、リン酸化を受けることが明らかになった。

2. Gab 1 のリン酸化に必要な gp130細胞内領域の決定

Gab 1 のリン酸化に必要な gp130内の細胞内領域を決定するために、G-CSF receptor の細胞外ドメインと gp130 細胞膜及び細胞内領域のキメラレセプターを安定導入した293T細胞を用い検討した。gp130の細胞内領域すべてを含む G277細胞、及びサイトカインレセプターに共通な BOX 1、BOX 2 領域までを含む G68細胞および gp130内のチロシン残基すべてをフェニルアラニンに置換したFall細胞を用いた結果、Gab 1 は G277細胞、G68細胞および Fall 細胞でも同じくリン酸化を受けた。以上より、Gab 1 のリン酸化には gp130細胞内のチロシン残基は全く必要がない事が示された。従って、Gab 1 は、おそらく gp130の細胞膜近傍に会合している、JAK により、直接リン酸化を受けているものと予想された。

3. SHP- 2 の脱リン酸化基質としての Gab 1 の役割

Gab 1 のショウジョウバエホモログの DOS は SHP- 2 のショウジョウバエホモログ CSW の基質である。そこで、Gab 1 が SHP- 2 の脱リン酸化の基質になりうるか検討した。HepG 2 細胞を IL- 6 で刺激し抗 Gab 1 抗体で免疫沈降することによりリン酸化 Gab 1 を作製した。これに、GST-SHP- 2 WT 及び酵素活性のない GST-SHP- 2 C/S を加え、in vitro phosphatase assay を行った。リン酸化 Gab 1 は GST-SHP- 2 C/S によっては、脱リン酸化は受けないが、GST-SHP- 2 WT を加えることにより著明に脱リン酸化を受けた。以上、Gab 1 が SHP- 2 の基質となっている可能性が示唆された。

4. Gab 1 の gp130シグナルにおける役割

Gab 1 の下流シグナルに対する役割を明らかにするために、gp130刺激依存性の MAP kinase の活性化に対する影響について検討した。G277細胞を用い ERK 2、JNK 1、P38 といった MAP kinase の活性化に対する Gab 1 の関与について検討した。G277細胞に、Flag tag を付加した ERK 2、JNK 1、P38 といった MAP kinase と、さらに Gab 1 を一過性に発現させ、刺激後 Flag tag に対する特異抗体による免疫沈降物を用い、in vitro kinase assay を行った。JNK 1、P38 に関しては、Gab 1 による kinase 活性の変化は刺激の有無に関わらず認められなかった。一方、ERK 2 に関しては、Gab 1 を発現させることにより gp130刺激依存性に kinase 活性は著明に増強した。以上より、Gab 1 が MAP kinase ERK の上流に位置し、下流シグナルを伝えていることが明らかになった。また、これらの Gab 1 を介する ERK の活性化は gp130内の SHP- 2 が結合できないチロシン759をフェニルアラニンに置換した G133F 2 細胞を用いた場合や、Dominant negative PI 3 -Kinase を発現させた場合、さらには Dominant negative Ras を発現させた場合においても著明に抑制された。以上より、Gab 1 を介する ERK の活性化には SHP- 2 のリン酸化や PI 3 -kinase の活性化及び Ras の活性化が深く関与していることが示唆された。

【総括】

gp130刺激依存的に、SHP- 2 に会合してくる分子量110kDa のチロシンリン酸化蛋白を見出し、その蛋白を Gab 1 と同定した。Gab 1 は、リン酸化を受けると SHP- 2 以外に PI 3 -Kinase とも会合し、さらに MAP kinase ERK の上流に位置していることを明らかにした。以上より、Gab 1 が gp130シグナルにおいて、Ras、PI 3 -Kinase といった下流分子を複雑に制御していることが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

本研究は、IL 6 ファミリーサイトカイン受容体の共通コンポーネントである gp130の刺激依存的に、リン酸化チロシン脱リン酸化酵素 SHP- 2 (SH 2 containig tyrosine phosphatase- 2) に会合してくる分子量110kDa のチロシンリン酸化蛋白を見出し、その蛋白をアダプター分子 Gab 1 (Grb 2 -associated binder- 1) と同定し、さらに gp130シグナルにおいて、Gab 1 が MAP kinase ERK の活性化に至るシグナルに関与していることを示したものである。

これまで、gp130内の細胞膜寄りのチロシン759に、SHP- 2 が会合し、このチロシン759をフェニルアラニンに置換した場合に SHP- 2 のチロシンリン酸化と gp130刺激依存性の MAP kinase ERK の活性化が抑制されることが明らかになっていた。しかしながら、SHP- 2 の脱リン酸化酵素としての基質は不明であった。本研究は、Gab 1 が S

HP-2の基質となりうることを示しただけでなく、gp130刺激依存性のMAP kinase ERKの活性化に必須の分子であることをはじめて明らかにした点で意義深い。それらを示すため本論文は、緻密に計画され、正確な分子生物学的手法に裏付けられた実験に基づいており、また総じて実験医学としての独創性に富んでいるため、博士（医学）の学位授与に値すると判断した。